



# 不同 7S 亚基组份的大豆蛋白纳米颗粒包埋 $\beta$ -胡萝卜素 Pickering 乳液研究

董鹏超<sup>1,2</sup>, 吕博<sup>1,2</sup>, 付洪玲<sup>1,2</sup>, 季雷<sup>1,2</sup>, 李浩铭<sup>1</sup>, 景文丹<sup>1,2</sup>, 谷春梅<sup>1,2</sup>, 于寒松<sup>1,2</sup>

(1. 吉林农业大学 食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118; 2. 国家大豆产业技术体系加工研究室, 吉林 长春 130118)

**摘要:**为探究不同 7S 亚基组份大豆蛋白纳米颗粒对包埋  $\beta$ -胡萝卜素 Pickering 乳液的影响, 本研究以野生型大豆 (Wild)、 $\alpha$  亚基缺失型大豆 ( $\alpha$ -lack)、 $\alpha'$  亚基缺失型大豆 ( $\alpha'$ -lack) 和 ( $\alpha + \alpha'$ ) 亚基缺失型大豆 [ $(\alpha + \alpha')$ -lack] 作为试验原料, 提取大豆分离蛋白 (SPI), 通过扫描电镜、粒径和表面疏水性对比热诱导前后蛋白的变化, 利用蛋白纳米颗粒为乳化剂制备包埋  $\beta$ -胡萝卜素 Pickering 乳液, 通过测定包埋  $\beta$ -胡萝卜素 Wild-NPPEs、 $\alpha$ -lack-NPPEs、 $\alpha'$ -lack-NPPEs 和 ( $\alpha + \alpha'$ )-lack-NPPEs 的粒径、抗氧化能力 (DPPH 自由基清除率)、 $\beta$ -胡萝卜素的保留率、模拟消化后的游离脂肪酸释放率和生物可及性等指标, 探索  $\alpha$ 、 $\alpha'$  亚基对包埋  $\beta$ -胡萝卜素的影响。结果表明: 通过热诱导可以制备不同亚基组份的蛋白纳米颗粒,  $\alpha'$  亚基对包埋  $\beta$ -胡萝卜素 Pickering 乳液的稳定性有影响, 在 4 °C 或 25 °C 下经过 30 d 贮藏后,  $\alpha'$ -lack-NPPEs 的  $\beta$ -胡萝卜素的最终保留率超过 70%, 且抗氧化活性最高; 通过体外模拟胃肠消化试验,  $\alpha'$ -lack-NPPEs 乳液液滴的界面面积比较大, 结合游离脂肪酸释放率结果发现, 随着聚合度降低、油滴表面积增加, 水解率提高, 使  $\beta$ -胡萝卜素在胶束相中的保留含量提高, 从而其生物可及性增加。综上,  $\alpha'$ -lack-NPs 更适合用于制备较稳定的包埋  $\beta$ -胡萝卜素 Pickering 乳液。

**关键词:** 蛋白纳米颗粒; 亚基缺失; Pickering 乳液;  $\beta$ -胡萝卜素

## Different 7S Subunits Composed Soybean Protein Nanoparticles for Embedding $\beta$ -carotene Pickering Emulsion

DONG Pengchao<sup>1,2</sup>, LYU Bo<sup>1,2</sup>, FU Hongling<sup>1,2</sup>, JI Lei<sup>1,2</sup>, LI Haoming<sup>1</sup>, JING Wendan<sup>1,2</sup>, GU Chunmei<sup>1,2</sup>, YU Hansong<sup>1,2</sup>

(1. School of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Division of Soybean Processing Soybean Research & Development Center, Chinese Agricultural Research System, Changchun 130118, China)

**Abstract:** In order to investigate the effects of soybean protein nanoparticles composed of different 7S subunits on  $\beta$ -carotene Pickering emulsion. In this study, wild type soybean (Wild),  $\alpha$  subunit deletion soybean ( $\alpha$ -lack),  $\alpha'$  subunit deletion soybean ( $\alpha'$ -lack) and ( $\alpha + \alpha'$ ) subunit deletion soybean ( $\alpha + \alpha'$ )-lack were used as raw materials to extract soybean protein isolate (SPI).  $\beta$ -carotene Pickering emulsion was prepared using protein nanoparticles as emulsifier by scanning electron microscopy, particle size and surface hydrophobicity changes before and after specific heat induction. The particle size, antioxidant capacity (DPPH radical scavenging rate),  $\beta$ -carotene retention rate, free fatty acid release rate and bioaccessibility of  $\beta$ -carotene Wild-NPPEs,  $\alpha$ -lack-NPPEs,  $\alpha'$ -lack-NPPEs and ( $\alpha + \alpha'$ )-lack-NPPEs were determined to explore the effect of  $\alpha$  and  $\alpha'$  subunits on embedding  $\beta$ -carotene. The results showed that: Protein nanoparticles with different subunits can be prepared by heat induction.  $\alpha'$  subunits have effects on the stability of  $\beta$ -carotene Pickering emulsion. After 30 days of storage at 4 °C or 25 °C, the final retention rate of  $\beta$ -carotene of  $\alpha'$ -lack-NPPEs was more than 70%, and the antioxidant activity was the highest. Through *in vitro* simulated gastrointestinal digestion test, the interface area of  $\alpha'$ -lack-NPPEs emulsion droplets was relatively large. Combined with the free fatty acid release rate, it was found that with the decrease of polymerization degree, the surface area of oil droplets increases, the hydrolysis rate increases, and the retention content of  $\beta$ -carotene in micellar phase increases, thus increasing its bioaccessibility. In conclusion,  $\alpha'$ -lack-NPs was more suitable for preparing stable  $\beta$ -carotene Pickering emulsion.

**Keywords:** protein nanoparticles; subunit deletion; Pickering emulsion;  $\beta$ -carotene

大豆蛋白含有人体必需的 8 种氨基酸, 是一种氨基酸组成比较均衡的植物性蛋白质<sup>[1]</sup>。大豆蛋白在不同离心力作用下 (即沉降系数), 通常可以分为 2S、7S、11S 和 15S 四类蛋白, 其中 7S 球蛋白和 11S 球蛋白为大豆蛋白中最重要的两种球蛋白<sup>[2]</sup>,

约占大豆蛋白的 70%, 是主要的大豆贮藏蛋白, 因此这两种球蛋白会对大豆蛋白的理化性质和功能特性影响较大。7S 球蛋白由 3 种基本成分组成:  $\beta$ -伴大豆球蛋白 ( $\beta$ -conglycinin)、 $\gamma$ -伴大豆球蛋白 ( $\gamma$ -conglycinin) 和碱性伴大豆球蛋白 (basic 7S

收稿日期: 2023-05-12

基金项目: 国家大豆产业技术体系专项 (CARS-04)。

第一作者: 董鹏超 (1997—), 女, 硕士研究生, 主要从事大豆精深加工及副产物综合利用研究。E-mail: DPC1005847464@163.com。

通讯作者: 谷春梅 (1976—), 女, 博士, 副教授, 主要从事农产品加工及营养调控研究。E-mail: jinong 2008@126.com;

于寒松 (1979—), 男, 博士, 教授, 主要从事大豆精深加工及综合利用研究。E-mail: yuhansong@163.com。

globulin),其中  $\beta$ -伴大豆球蛋白是 7S 球蛋白中最重要的一种。Yoshino 等<sup>[3]</sup>利用 X 射线晶体学所描述出的 7S 球蛋白的晶体结构,是一种由  $\alpha$ 、 $\alpha'$ 、 $\beta$  3 个亚基通过疏水相互作用力和非共价键以平面三角形的形式紧密排列的三聚体糖蛋白<sup>[4]</sup>。

20 世纪初, Pickering<sup>[5]</sup>发现 Pickering 乳液或皮克林乳液,其含有稳定乳液的固体颗粒,此颗粒通常是微米级或纳米级的,称为皮克林颗粒。Pickering 乳液的稳定机理与传统乳液不同,前者是通过附着在油水界面上的固态颗粒来改变界面、增加空间中的位阻及非分散相的流变性以达到稳定效果<sup>[6]</sup>;后者是通过具有双亲性的表面活性剂分子附着在界面上,以减小界面张力为目的来稳定乳液体系<sup>[7]</sup>。Pickering 乳液可作为一种特殊且理想的载体,包埋和释放功能性活性物质,

同时增强其物理、氧化稳定性<sup>[8]</sup>。Liu 等<sup>[9]</sup>用大豆球蛋白颗粒制备 Pickering 乳液,研究其对  $\beta$ -胡萝卜素的包埋与释放。研究发现,乳液的凝胶状网络的形成能够显著降低包埋物质  $\beta$ -胡萝卜素的释放。Geng 等<sup>[10]</sup>利用大豆分离蛋白(SPI)和表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)共价复合微凝胶颗粒制备高内相 Pickering 乳液对  $\beta$ -胡萝卜素的包埋与释放,显著提高了  $\beta$ -胡萝卜素的化学稳定性和  $\beta$ -胡萝卜素的生物可及性。Faraji 等<sup>[11]</sup>研究表明 SPI 乳液较其他不同蛋白乳液包埋鱼油氧化稳定性效果更好。

功能性活性物质  $\beta$ -胡萝卜素是一种类胡萝卜素,仅由两种碳氢化合物元素组成,分子量大,不溶于水,具有较高的脂肪溶解度,在室温下也很难溶于食用油<sup>[12]</sup>。 $\beta$ -胡萝卜素也是一种抗氧化剂,主要应用于合成维生素 A,同时提高机体免疫力,具有一定的抗癌作用。 $\beta$ -胡萝卜素不是由自身产生的,必须通过饮食来消化和吸收,因此有必要增加  $\beta$ -胡萝卜素应用在食品生产中的稳定性。研究表明, $\beta$ -胡萝卜素在室温下容易氧化,在食品加工和储存过程中容易降解<sup>[13]</sup>,产生不良降解产物,难以保持其生物活性,这也会降低维生素生物 A 活性和抗氧化活性。上述因素极大地限制了  $\beta$ -胡萝卜素在食品工业中的应用。为解决  $\beta$ -胡萝卜素不稳定、难以吸收问题。从蛋白原料出发,促进  $\beta$ -胡萝卜素 Pickering 乳液体系在食品工业中应用<sup>[14]</sup>。同时,体外消化模型实验通过模拟人体消化环境,把消化分解吸收营养物质,并对  $\beta$ -胡萝卜素乳液的消化效果进行科学评估。

因此,本研究通过制备包埋缓释  $\beta$ -胡萝卜素的不同亚基缺失型热致蛋白纳米颗粒 Pickering 乳液,继而通过对其粒径、贮藏稳定性、DPPH 自由基清除能力、游离脂肪酸释放率和生物可及性等指标的测

定,探究  $\alpha$ 、 $\alpha'$ 亚基对大豆分离蛋白 Pickering 乳液对  $\beta$ -胡萝卜素的包埋缓释特性的影响,也为响应国家现代农业体系提倡的“加工品种专用化”的行业趋势,初步建立起包埋  $\beta$ -胡萝卜素的亚基缺失型大豆蛋白 Pickering 乳液表征指标,为开发植物基大豆蛋白系列产品提供了切实可行的新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以大豆 Wild 野生型(天然个体非人工诱导)、 $\alpha$  亚基缺失型、 $\alpha'$ 亚基缺失型和( $\alpha + \alpha'$ )亚基缺失型为材料,来源于东北农业大学农学院大豆生物学教育部重点实验室刘珊珊教授团队。所用试剂均为国产分析纯。

主要仪器包括高速多功能粉碎机(CS-2000 型,永康市天祺盛世工贸有限公司)、数显 pH 计(FE28 型,上海梅特勒-托利多仪器有限公司)、磁力搅拌器[MYP11-2A 型,梅颖浦仪器仪表制造(上海)有限公司]、离心机(Avanti JXN-26,美国 BECKMAN-COULTER 有限公司)、荧光酶标仪[VICTOR NivoTM 型,珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司]及冷冻干燥器(FDU-7006 型,韩国 OPERON 公司)等。

### 1.2 方法

1.2.1 大豆分离蛋白制备 参考 Li 等<sup>[15]</sup>的方法并稍作修改。将 4 种大豆通过脱皮机脱皮,研磨机粉碎,并通过 60 目筛过筛。将该粉末与丙酮 1:5 (m/v)混合以制备脱脂豆粉,将其使用磁力搅拌器搅拌 0.5 h 后,放置 1 h,吸取上清液并反复进行以上过程。上清液无色后,干燥粉末。根据碱溶酸沉的原理,将脱脂豆粉与去离子水以 1:10 ( $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的比例进行搅拌,并使用  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 溶液调整至 pH8.5,充分搅拌 2 h。以  $14\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$  离心 30 min,得到上清液,用  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl 调整至 pH4.5,充分搅拌 2 h。 $14\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$  离心 30 min,并取出沉淀,进行多次清水洗涤,再用  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 溶液调整至 pH7.0,充分搅拌 2 h。在  $14\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$  离心 30 min,取清液,于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  下透析 48 h,并把透析液冷冻干燥,置于干燥器中备用。将 4 种蛋白分别标记为: Wild、 $\alpha$ -lack、 $\alpha'$ -lack 以及( $\alpha + \alpha'$ )-lack。

1.2.2 蛋白纳米颗粒制备 根据 Li 等<sup>[16]</sup>的方法并稍作修改。室温下准确称量 4 种 SPI,分别溶于去离子水中制成 2% SPI 溶液,搅拌混匀 2 h,放置在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冷冻室中贮存过夜水化,并在 4 种溶液中分别添加 0.02% 叠氮钠,抑制溶液中的微生物生长。将 4 种蛋白溶液调至 pH7.0,并用高速离心机离心 0.5 h,除去底部不溶物质。将 4 种 SPI 溶液分别放

置于 95 ℃ 恒温磁力搅拌水浴锅中加热搅拌 30 min, 加热结束后立即进行冰浴, 使溶液冷却至室温, 冷冻干燥备用。将 4 种蛋白纳米颗粒分别标记为: Wild-NPs、 $\alpha$ -lack-NPs、 $\alpha'$ -lack-NPs 和  $(\alpha + \alpha')$ -lack-NPs。

1.2.3 扫描电镜显微镜观察 根据 Minić 等<sup>[17]</sup>的方法并稍作修改, 将冷冻干燥后的 SPI 和蛋白纳米颗粒 8 种样品表面溅射镀金, 通过扫描电子显微镜对样品进行形态学研究。

1.2.4 粒径测定 根据 Igartúa 等<sup>[18]</sup>的方法并稍作修改, 将 4 种 SPI 和 1.2.2 所制 SPI 纳米颗粒分别用去离子水水化, 并于常温下用磁力搅拌机持续搅拌 2 h, 确保蛋白充分溶解后放置在 4 ℃ 冰箱内过夜水合。将样品溶液稀释 100 倍后, 利用动态光散射与粒度分析仪测定所制备样品的粒径, 从而避免由多重光散射引起的干扰。

1.2.5 表面疏水性测定 根据 Zhang 等<sup>[19]</sup>的方法并稍作修改, 使用 1-苯胺基萘-8-磺酸 (ANS) 测定表面疏水性 ( $H_0$ )。即将 4 种 SPI 和 1.2.2 所制 SPI 纳米颗粒分别溶解在 10 mmol·L<sup>-1</sup> PBS (pH7.0) 中, 得到 1 mg·mL<sup>-1</sup> 蛋白质溶液, 将其稀释至不同浓度 (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 和 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>)。将每种稀释的 SPI 溶液 (2 mL) 与 25  $\mu$ L ANS (8.0 mmol·L<sup>-1</sup>, pH7.0) 混合。黑暗中反应 0.5 h, 在 390 nm (激发波长)、470 nm (发射波长) 和 5 nm (狭缝宽度) 下测定 8 种样品荧光强度。记录荧光强度与蛋白质浓度并进行线性拟合, 其斜率对应于蛋白质的表面疏水性。

1.2.6 包埋  $\beta$ -胡萝卜素的 Pickering 乳液的制备 根据 Wei 等<sup>[20]</sup>的制备方法并稍作修改。将 1.2.2 所制备的蛋白纳米颗粒溶液作为水相, 添加大豆油 (含有  $\beta$ -胡萝卜素) 作为油相 (1 mg·mL<sup>-1</sup>)。在 10 000 r·min<sup>-1</sup> 条件下用高速剪切乳化机剪切 3 min, 制备初乳。使用高压均质机在 400 bar 条件下均质 3 次, 制备不同亚基缺失型大豆蛋白 Pickering 乳液。加入 0.02% 叠氮化钠抑制微生物生长。同时为了避免光、热等因素影响  $\beta$ -胡萝卜素, 将乳液密封并用锡箔纸包裹储存。

1.2.7 Pickering 乳液中  $\beta$ -胡萝卜素保留率的测定 根据倪洋<sup>[21]</sup>的方法并稍作修改。准确取 1 mL 乳液 (其中包埋有  $\beta$ -胡萝卜素), 添加到 5 mL 混合溶液 (无水乙醇: 正己烷 = 2:3)。涡旋 30 s 后在 6 000 g 条件下离心 5 min 后, 取其上层清液, 再用 1 mL 正己烷重复以上步骤, 至乙醇无色即可。将所取的上层清液用正己烷定容至 10 mL, 在 450 nm 处进行吸光度测定。以  $\beta$ -胡萝卜素的标记曲线为基础, 计算该乳液中  $\beta$ -胡萝卜素的含量。在该乳液中  $\beta$ -胡萝卜素的保留

率计算公式为:  $\beta$ -胡萝卜素保留率 (%) =  $\frac{C_t}{C_0} \times 100$ , 式中,  $C_t$ —相应贮藏时间或温度下乳液中  $\beta$ -胡萝卜素的浓度 (mg·mL<sup>-1</sup>),  $C_0$ —0 min 处的吸光度最初乳液中  $\beta$ -胡萝卜素的浓度 (mg·mL<sup>-1</sup>)。

1.2.8 包埋  $\beta$ -胡萝卜素 Pickering 乳液粒径测定方法同 1.2.4。

1.2.9 包埋  $\beta$ -胡萝卜素 Pickering 乳液贮藏稳定性测定 将新鲜制备的乳液置于玻璃瓶中, 在 4 ℃ 和 25 ℃ 的温度下, 将其储藏 30 d (不需要避光), 每隔 5 d 以  $\beta$ -胡萝卜素的标记曲线为基础, 对该乳液中的  $\beta$ -胡萝卜素的保留率进行测定。

1.2.10 DPPH 自由基清除能力测定 根据 Yang 等<sup>[22]</sup>的方法并稍作修改。取 2 mL 乳液与 2 mL 用乙醇溶解的 60  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> DPPH 溶液, 充分混匀后放置于避光处 30 min, 并在波长为 517 nm 时测定吸光值。乳液的 DPPH 自由基清除率计算公式为:

DPPH 清除率 (%) =  $\frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100$ , 式中,  $A_0$ —用蒸馏水代替样品溶液的空白样吸光值,  $A_1$ —加入样品的溶液吸光值,  $A_2$ —不加 DPPH 的溶液吸光值。

1.2.11 包埋  $\beta$ -胡萝卜素 Pickering 乳液模拟体外消化 根据 Dai 等<sup>[23]</sup>的方法并稍作修改。由于乳液摄入在口腔内的停留时间较短, 而且口腔中主要作用在于淀粉的唾液淀粉酶, 故对包埋  $\beta$ -胡萝卜素的 Pickering 乳液在胃和肠道中的消化过程进行研究, 构建模拟胃肠道消化模型。胃阶段: 将 50 mL Pickering 乳液与 50 mL 模拟胃液 (SGF), 其中含有 3.2 mg·mL<sup>-1</sup> 胃蛋白酶, 以模拟胃消化; 在 pH2.0 条件下, 将样品于 37 ℃ 旋转水浴锅 150 r·min<sup>-1</sup> 旋转 1 h, 模拟胃部消化。小肠阶段: 将 20 mL 胃液移至 100 mL 玻璃烧杯中, 调整至 pH7.0。最后将包含 5 mg·mL<sup>-1</sup> 胆汁盐的 20 mL 模拟肠液 (SIF)、0.4 mg·mL<sup>-1</sup> 胰酶和 3.2 mg·mL<sup>-1</sup> 脂肪酶在旋转水浴锅中与胃消化液混合。将 pH7.0 样品在 150 r·min<sup>-1</sup>、37 ℃ 条件下连续振动 2 h, 模拟肠道消化。

1.2.12 游离脂肪酸 (FFA) 释放率测定 在模拟小肠的消化系统中, 乳液中的油脂会被胰蛋白酶分解成为游离脂肪酸。水解过程为: 在脂肪酶的作用下, 一分子甘油三酯在脂肪酶的催化下被水解成一分子甘油单体酯与两分子游离脂肪酸<sup>[24]</sup>。因此, 在水解过程中, 由于 H<sup>+</sup> 不断产生, 体系 pH 值降低。在模拟肠道消化过程中, 用 pH-stat 法<sup>[25]</sup> 测定小肠消化阶段的游离脂肪酸 (FFAs) 释放量。计算公式为:  $FFA$  (%) =  $\frac{V_{NaOH} \times C_{NaOH} \times M_{大豆油}}{2m_{大豆油}} \times 100$ , 式

中,  $V_{\text{NaOH}}$ —时间为  $t$  时消耗 NaOH 的体积 (L),  $C_{\text{NaOH}}$ —NaOH 溶液的浓度 ( $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $M_{\text{大豆油}}$ —大豆油的平均分子质量 ( $876 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ )。

1.2.13  $\beta$ -胡萝卜素生物可及性 (BC) 测定 根据 Qian 等<sup>[26]</sup>的方法并稍作修改,取模拟体外消化后的混合体系在  $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  条件下离心 30 min。离心后的样品底部分离为不透明的沉积物相,中间为透明的胶束相,顶部为未消化的油状或奶油状相。中间相被认为是由溶解生物活性成分的混合胶束组成,吸取胶束层,使用  $0.22 \mu\text{m}$  过滤器除去中间相的残留大颗粒。使用 5 mL 混合溶液 (无水乙醇:正己烷 = 2:3) 进行萃取,至乙醇无色即可,将所取的上层清液用正己烷定容至 10 mL,在 450 nm 处进行吸光度测定。由  $\beta$ -胡萝卜素的标记曲线推算该乳剂中  $\beta$ -胡萝卜素的含量,计算  $\beta$ -胡萝卜素的生物可及性 (BC)。

$$BC(\%) = \frac{\text{胶束中 } \beta\text{-胡萝卜素的含量}}{\text{乳液中 } \beta\text{-胡萝卜素的含量}} \times 100.$$

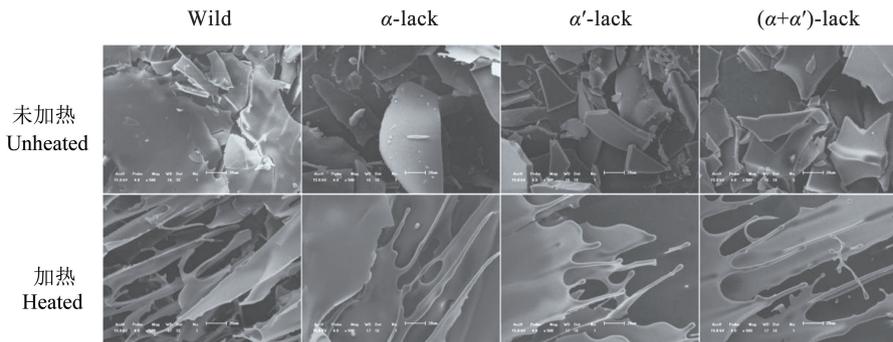


图 1 4 种大豆分离蛋白和蛋白纳米颗粒的 SEM 扫描电镜下的微观形态 (500 ×)

Fig. 1 Microstructure of four kinds of soy protein isolate and thermally induced nanoparticles under SEM (500 ×)

## 2.2 $\alpha$ 、 $\alpha'$ 亚基缺失对大豆蛋白和蛋白纳米颗粒粒径的影响

4 种加热与未加热的 SPI 的粒径如图 2 所示,未进行加热处理的 4 种蛋白粒径分别为 138.09, 229.70, 136.46 和 103.76 nm。梁会会<sup>[28]</sup>研究也证明了未加热的 SPI 粒径为 51.71 ~ 222.43 nm,在 95 °C 加热 30 min 条件下形成的蛋白纳米颗粒的粒径分别为 373.77, 273.50, 385.33 和 124.53 nm。与未加热的 SPI 相比,经过热处理后的 SPI 纳米颗粒的粒径均增加,可能是因为加热处理可以使得蛋白从小分子的形式变成聚合物的形式,并且使其大量的疏水集团暴露。其中,  $\alpha'$ -lack-NPs 的粒径相对较大 (纳米级别),根据公式  $\Delta E = \pi^2 \gamma (1 - |\cos \theta|)^2$ <sup>[29]</sup>,纳米颗粒的粒径  $\gamma$  越大,则与油水接触的面积就越大,所以颗粒从油水界面成功解吸需要的能量就越大<sup>[30]</sup>。结果表明,  $\alpha'$ -lack-NPs 是 Pickering 乳液稳定性的有利因素。因此,可推断热诱导可以使得 SPI 形成 SPI 纳米颗粒。

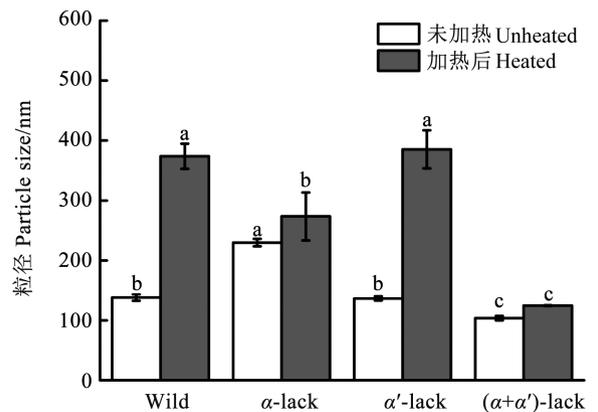
## 1.3 数据分析

所有试验至少 3 次重复,结果以平均值  $\pm$  标准偏差表示。采用单因素方差分析 (ANOVA) 方法,使用 Origin 8.1 和 SPSS Statistics 24 软件进行数据统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\alpha$ 、 $\alpha'$ 亚基缺失对大豆蛋白和蛋白纳米颗粒微观形态的影响

通过扫描电镜观察 4 种大豆蛋白和热致纳米颗粒的微观形态,结果如图 1 所示:4 种未经加热的冷冻干燥蛋白质粉末呈平滑的不规则层状结构;而 4 种通过热处理得到的纳米颗粒的冷冻干燥粉末的蛋白质片层变成多孔结构,对水化起到更好的促进作用。因此热处理对改善粒状冻干粉的溶解度有利<sup>[27]</sup>。



注:不同字母表示有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。下同。

Note: Different letters represent significant differences ( $P < 0.05$ ). The same below.

图 2  $\alpha$ 、 $\alpha'$ 亚基缺失对大豆分离蛋白和蛋白纳米颗粒粒径的影响

Fig. 2 Effects of  $\alpha$  and  $\alpha'$  subunit deletion on particle size of soy protein isolate and protein nanoparticles

### 2.3 $\alpha$ 、 $\alpha'$ 亚基缺失对大豆蛋白和大豆蛋白纳米颗粒表面疏水性的影响

大豆蛋白纳米颗粒的表面疏水性是影响其表面相关功能的重要参数之一。4种加热与未加热处理的SPI的表面疏水性如图3所示,与未加热的SPI相比,经过热诱导后的不同亚基缺失型大豆蛋白纳米颗粒的表面疏水性均增加,可能是因为热诱导使得表面的疏水基团暴露,且由大到小变化趋势为: $\alpha'$ -lack-NPs > Wild-NPs >  $\alpha$ -lack-NPs > ( $\alpha + \alpha'$ )-lack-NPs。不同亚基缺失型的大豆蛋白纳米颗粒的表面疏水性不同,这可能与大豆蛋白纳米颗粒不同的表面疏水基团和空间构象有关。其中, $\alpha'$ -lack-NPs的表面疏水性最高,这可能是由于蛋白质分子被更多地扩展。随着更多的表面疏水基团和疏水氨基酸暴露出来,导致 $H_0$ 增加。 $H_0$ 越高,在蛋白质的表面,具有更强的疏水性,更多的大分子聚集体在溶液中生成,可溶性聚集体体积越大。同时,在分子的表面上露出更多的疏水性官能团,有利于通过分子间疏水相互作用进行交联,增加了结构特性<sup>[31]</sup>。这对微粒在油-水界面上的吸附与重排,以及对乳液的性质及稳定性有重要的作用。

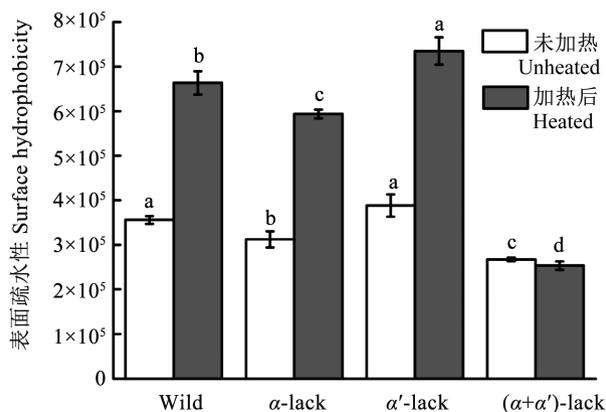


图3  $\alpha$ 、 $\alpha'$ 亚基缺失对大豆蛋白纳米颗粒表面疏水性的影响  
Fig. 3 Effects of  $\alpha$  and  $\alpha'$  subunit deletion on surface hydrophobicity of protein nanoparticles

### 2.4 $\alpha$ 、 $\alpha'$ 亚基缺失对包埋 $\beta$ -胡萝卜素的Pickering乳液粒径的影响

研究证明乳液液滴的粒径越小,所形成的乳液稳定性越高<sup>[32]</sup>。乳液的粒径不仅影响被包埋物质的生物利用率,同时也能为纳米体系的稳定性提供依据。4种包埋 $\beta$ -胡萝卜素的Pickering乳液的粒径如图4所示,其中 $\alpha'$ -lack-NPPEs的粒径较小,这可能是由于 $\alpha'$ -lack-NPs的表面具有较多的疏水基团,可以包埋或吸附 $\beta$ -胡萝卜素在蛋白质纳米颗粒的表面,从而形成了较为致密网络结构,与Kornél等<sup>[33]</sup>研究结果一致。

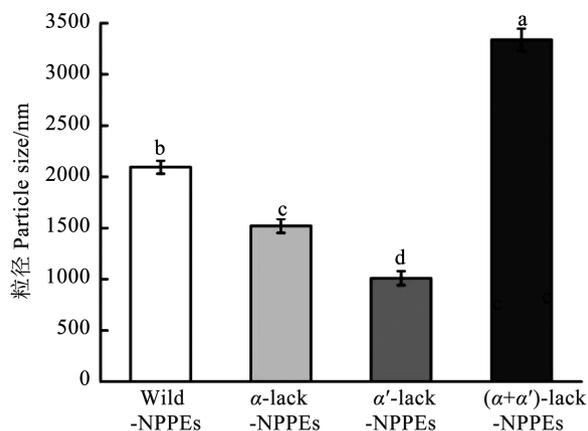


图4  $\alpha$ 、 $\alpha'$ 亚基缺失对包埋 $\beta$ -胡萝卜素的Pickering乳液粒径的影响

### Fig. 4 Effects of $\alpha$ and $\alpha'$ subunit deletion on particle size of Pickering emulsion coated with $\beta$ -carotene

### 2.5 $\alpha$ 、 $\alpha'$ 亚基缺失对包埋 $\beta$ -胡萝卜素的Pickering乳液贮藏稳定性的影响

稳定性好的Pickering乳液可大大增加包埋 $\beta$ -胡萝卜素在工业加工中的应用机会。同时稳定性是评价乳液包埋递送的重要指标。 $\beta$ -胡萝卜素很容易分解,在工业上的应用也很有限。在4℃和25℃(无光保护)的储存温度下,30d内定期监测Pickering乳液中 $\beta$ -胡萝卜素的保留率。如图5所示,在不同温度下, $\beta$ -胡萝卜素保留率随着储存天数的增加而逐渐减少。4种Pickering乳液在4℃下保存30d后, $\beta$ -胡萝卜素最终保留率超过70%。4种Pickering乳液在25℃条件下贮存30d后, $\beta$ -胡萝卜素最终保留率与4℃条件相比有所下降,对其在Pickering乳液中的保留会产生负面影响。Pickering乳液在低温下对 $\beta$ -胡萝卜素的包埋效果更佳,出现这种情况的原因可能是低温下蛋白质纳米颗粒在油-水界面上形成的紧密防护薄膜所致,对防止 $\beta$ -胡萝卜素的氧化降解具有良好的阻隔作用。因此,Pickering乳液用于嵌入 $\beta$ -胡萝卜素可以很好地提高其保留率。其中, $\alpha'$ -lack-NPPEs的保留率相对较高,这可能是由于乳液的粒径较小,分布均匀,在油-水界面上分布得更加密致,包封更完整,与空气接触时没有氧化降解,所以能更好地保护 $\beta$ -胡萝卜素,使得其保留率较高。

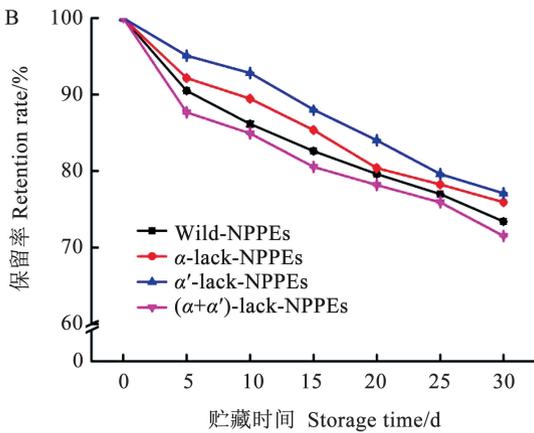
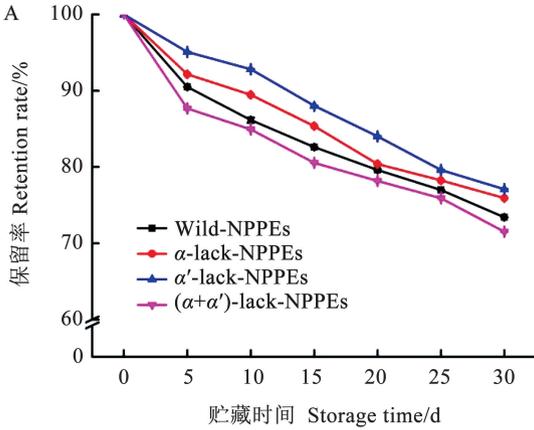
### 2.6 $\alpha$ 、 $\alpha'$ 亚基缺失对包埋 $\beta$ -胡萝卜素的Pickering乳液DPPH自由基清除率的影响

采用DPPH法测定亚基缺失型大豆蛋白包埋 $\beta$ -胡萝卜素抗氧化活性的结果如图6所示, $\alpha'$ -lack-NPPEs的DPPH自由基清除率(92.41% ± 0.62%)略高于 $\alpha$ -lack-NPPEs(92.24% ± 0.84%)且显著高于Wild-NPPEs(87.13% ± 1.76%)以及( $\alpha + \alpha'$ )-lack-NPPEs(86.30% ± 0.62%)。结果表明, $\alpha'$ -

lack-NPPEs 的 DPPH 自由基清除能力是最强的,由此可得出  $\alpha'$ -lack-NPPEs 可以较好地保留  $\beta$ -胡萝卜素优越的抗氧化性能。

## 2.7 $\alpha$ 、 $\alpha'$ 亚基缺失对包埋 $\beta$ -胡萝卜素的 Pickering 乳液游离脂肪酸释放率的影响

在模拟肠道消化过程中,油脂被胰脂肪酶酶解生成单甘油酯、二酯和游离脂肪酸。通过加入 NaOH 中和游离脂肪酸,保持体系在中性条件下研究不同蛋白质纳米颗粒作为乳化剂在 Pickering 乳液中对油脂消化的影响,以及乳液对  $\beta$ -胡萝卜素包埋输送的影响<sup>[34]</sup>。如图 7 所示,随着消化时间的延长,游离脂肪酸的释放逐渐增加,释放速率逐渐降低。油脂水解属于一种多相反应,因此其反应速度与界面区域的尺寸密切相关。在消化过程的初始阶段,乳液液滴的界面区域相对较大,脂肪水解速度比较快,游离脂肪酸的释放量急剧增加。因此,在后期,由于油脂水解产物在界面上的积累和乳液液滴界面面积的减小(粒径增大),脂肪水解速率显著降低,游离脂肪酸的释放量逐渐减少。但是,在各种类型的乳液中,其油脂的水解率和水解量存在一定差异。其中, $\alpha'$ -lack-NPPEs 的游离脂肪酸释放速率更快,乳液的粒径更小(图 4),比表面积更大,较大的比表面积有助于增加油和胃液之间的接触面积,因此更容易加速溶脂。



注:A. 4 °C; B. 25 °C。

Note: A. 4 °C; B. 25 °C.

图 5  $\alpha$ 、 $\alpha'$ 亚基缺失 Pickering 乳液在不同储藏温度下储藏时间对  $\beta$ -胡萝卜素保留率的影响

Fig. 5 Effects of storage time on  $\beta$ -carotene retention of Pickering emulsion with  $\alpha$  and  $\alpha'$  subunit deletion at different storage temperatures

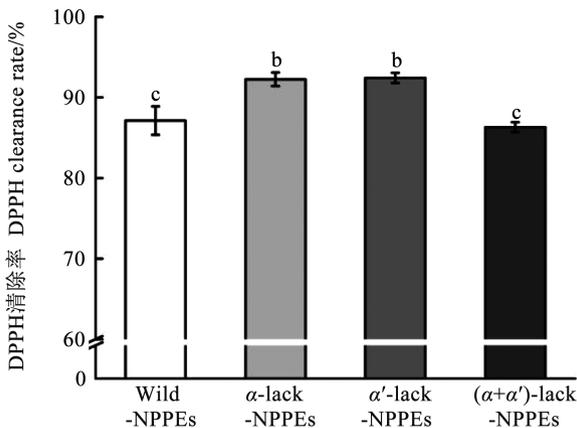


图 6  $\alpha$ 、 $\alpha'$ 亚基缺失对包埋  $\beta$ -胡萝卜素 Pickering 乳液 DPPH 抗氧化能力的影响

Fig. 6 Effects of  $\alpha$  and  $\alpha'$  subunit deletion on antioxidant capacity of  $\beta$ -carotene Pickering emulsion DPPH

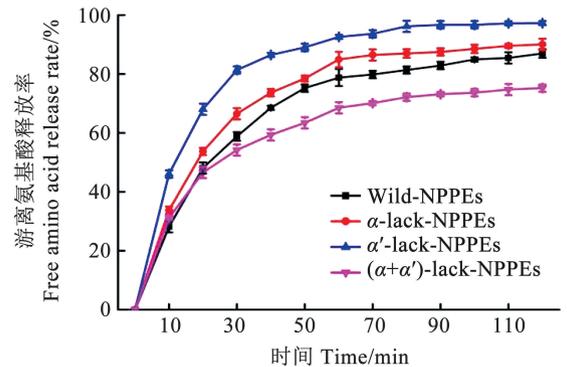


图 7  $\alpha$ 、 $\alpha'$ 亚基缺失对包埋  $\beta$ -胡萝卜素的 Pickering 乳液对游离氨基酸的影响

Fig. 7 Effects of  $\alpha$  and  $\alpha'$  subunit deletion on free amino acids in Pickering emulsion coated with  $\beta$ -carotene

## 2.8 $\alpha$ 、 $\alpha'$ 亚基缺失对包埋 $\beta$ -胡萝卜素的 Pickering 乳液生物可及性的影响

Pickering 乳液包埋递送的营养物质会在模拟肠道消化阶段的脂肪水解过程中不断从脂肪中释放出来。其中  $\beta$ -胡萝卜素分子较大,生物利用度通常较低。 $\beta$ -胡萝卜素需要在小肠内与胆盐和脂肪酸混合形成胶束,继而被小肠上皮细胞吸收<sup>[35]</sup>。通过测定  $\beta$ -胡萝卜素浓度来确定生物利用度<sup>[36]</sup>。如图 8 所示,该结果与 FFA 释放结果呈正相关,脂肪水解程度与营养物质生物利用度呈正相关。脂肪水解的减少会影响体系中胶束的形成, $\beta$ -胡萝卜素载体

胶束的减少直接导致生物利用度降低。其中  $\alpha'$ -lack-NPPEs 的生物利用度较高,可能是因为  $\alpha'$ -lack-NPPEs 的粒径较小、具有较大的比表面积。较多的界面颗粒有利于胆盐和胰蛋白酶的快速吸附。酪蛋白在胃中消化后,被胃蛋白酶酶解,参与胶束的形成,有利于  $\beta$ -胡萝卜素从 Pickering 乳液中释放到胶束相。

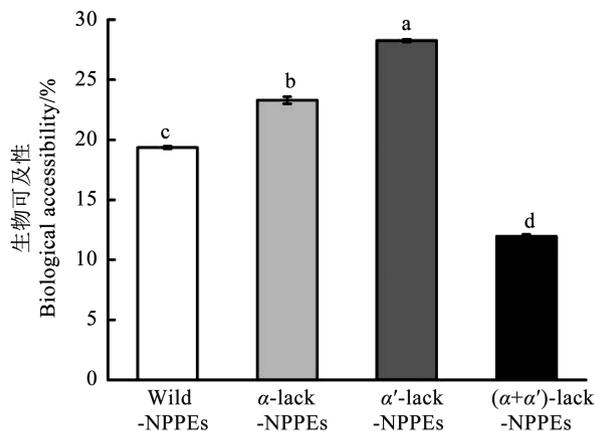


图8  $\alpha$ 、 $\alpha'$ 亚基缺失 Pickering 乳液对  $\beta$ -胡萝卜素生物可及性的影响

Fig. 8 Effects of Pickering emulsion with  $\alpha$  and  $\alpha'$  subunit deletion on bioaccessibility of  $\beta$ -caroten

### 3 讨论

通过蛋白微观形态、粒径和表面疏水性对比 SPI 和 SPI 纳米颗粒的变化,相比未加热的 SPI,热诱导后的 SPI 粒径变大,表明蛋白发生了聚集,与 Li 等<sup>[37]</sup>研究相一致;热诱导后的 SPI 表面形成了大量的多孔状结构,表明热诱导可形成蛋白纳米颗粒,同时表面疏水性的增加有利于乳液的稳定性。对比贮藏稳定性结果, $\beta$ -胡萝卜素会在光照和接触氧气条件下易发生氧化反应而降解,但是 Pickering 乳液可以将这些影响因子隔离,使得  $\beta$ -胡萝卜素的保留率较多。结合粒径结果显示,包埋  $\beta$ -胡萝卜素的  $\alpha'$ -lack-NPPEs 粒径较小,可能是因为  $\alpha'$ -lack-NPs 的粒径较大,表面覆盖率较高,在油滴的表面构成致密的保护膜,在储存过程中,当乳液发生移动时,很可能会相互撞击,从而聚合成更大颗粒的乳液。根据生物可及性结果, $\alpha'$ -lack-NPPEs 的生物可及性较高,可能是因为 Pickering 乳液油滴表面的颗粒促进了消化过程中脂肪酸的释放,增加了胶束的形成,进而导致  $\beta$ -胡萝卜素的释放增加。另外,包埋  $\beta$ -胡萝卜素的 Pickering 乳液,因其乳液粒径尺寸愈小,而比表面积就会愈大,聚集度也愈小;在模拟消化的过程中,对脂肪进行消化的程度愈大,其生物可及率就会愈高。与 Salvia 等<sup>[38]</sup>的研究结果相同。结合游离脂肪酸释放率结果显示,聚合度愈低,会

使油滴总的表面积愈加增大,进而使脂肪的水解速度提高。DPPH 自由基清除率结果显示, $\alpha'$ -lack-NPPEs 的 DPPH 自由基清除能力更好,这可能是由于  $\alpha'$ -lack-NPPEs 的稳定性更好,反应过程中更小的乳液油滴增加了其与 DPPH 自由基之间的接触面积,使得自由基的清除能力更好,具有更好的抗氧化效果。

### 4 结论

不同亚基缺失型 SPI 通过热诱导处理,SPI 纳米颗粒的粒径和表面疏水性(疏水基团的暴露)增强,使得其聚集形成絮凝颗粒,稳定 Pickering 乳液的潜力增强。 $\alpha$  亚基或  $\alpha'$  亚基缺失对大豆分离蛋白 Pickering 乳液对  $\beta$ -胡萝卜素的包埋和缓释具有保护屏障作用,同时提高了游离脂肪酸的释放率和生物利用度。其中, $\alpha'$ -lack-NPPEs 在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、25  $^{\circ}\text{C}$  条件下贮藏, $\beta$ -胡萝卜素的保留率相对较高,抗氧化能力最佳且溶脂能力较强。综合表明, $\alpha'$ -lack-NPs 的稳定性最高、 $\beta$ -胡萝卜素的保留率高、抗氧化活性高且模拟为肠道消化的效果最优。可能是因为形成乳液时, $\alpha'$ -lack-NPs 与油滴在一起形成致密而稳定的网络,为聚结和 Ostwald 成熟提供了空间位阻,并提高了乳液的稳定性,所以  $\alpha'$ -lack-NPs 更适合用于制备较稳定的包埋  $\beta$ -胡萝卜素 Pickering 乳液。本研究促进专用品种推广,开发高加工性能的大豆分离蛋白,结果能够为今后研制出一种具有自主知识产权的新型 Pickering 乳液及其在实际生产中的应用奠定基础。

### 参考文献

- [1] PI X W, SUN Y X, LIU J F, et al. Characterization of the improved functionality in soybean protein-proanthocyanidins conjugates prepared by the alkali treatment [J]. Food Hydrocolloids, 2023, 134: 108107.
- [2] SUN Y D, ZHONG M M, ZHAO X M, et al. Stability and digestion characteristics of pickering high internal phase emulsions formed by acid-induced soy lipophilic protein,  $\beta$ -conglycinin, and globulin [J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 153: 112554.
- [3] YOSHINO M, TSUTSUMI K, KANAZAWA A. Profiles of embryonic nuclear protein binding to the proximal promoter region of the soybean  $\beta$ -conglycinin  $\alpha$  subunit gene [J]. Plant Biology, 2015, 17(1): 147-152.
- [4] ZHANG J Y, WANG J, LI M G, et al. Effects of heat treatment on protein molecular structure and *in vitro* digestion in whole soybeans with different moisture content [J]. Food Research International, 2022, 155: 111115.
- [5] PICKERING S F. A review of the critical constants of various gases [J]. The Journal of Physical Chemistry, 1924, 28(2): 97-124.
- [6] XIAO J, WANG X A, ALEJANDRO J P G, et al. Kafirin nanoparticles-stabilized Pickering emulsions: Microstructure and

- rheological behavior[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 54: 30-39.
- [7] SUN F W, LI B L, GUO Y N, et al. Effects of ultrasonic pretreatment of soybean protein isolate on the binding efficiency, structural changes, and bioavailability of a protein-luteolin nanodelivery system [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2022, 88: 106075.
- [8] TIKEKAR R V, PAN Y, NITIN N. Fate of curcumin encapsulated in silica nanoparticle stabilized Pickering emulsion during storage and simulated digestion [J]. *Food Research International*, 2013, 51(1): 370-377.
- [9] LIU F, TANG C H. Soy glycinin as food-grade Pickering stabilizers: Part. III. Fabrication of gel-like emulsions and their potential as sustained-release delivery systems for  $\beta$ -carotene [J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 56: 434-444.
- [10] GENG M J, LI L J, FENG X M, et al. Encapsulation of  $\beta$ -carotene in high internal phase Pickering emulsions stabilized by soy protein isolate-epigallocatechin-3-gallate covalent composite microgel particles [J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2022, 360: 119511.
- [11] FARAJI H, MCCLEMENTS D J, DECKER E A. Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-water emulsions[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(14): 4558-4564.
- [12] MA Y, XU L, ZHANG J, et al. Effect of ultra-high pressure physical energy on carotenoid isomers in carrot juice [J]. *Food Science*, 2008, 29(10): 105-108.
- [13] BOON C S, MCCLEMENTS D J, WEISS J, et al. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2010, 50(6): 515-532.
- [14] MCCLEMENTS D J, XIAO H. Potential biological fate of ingested nanoemulsions: Influence of particle characteristics [J]. *Food & Function*, 2012, 3(3): 202-220.
- [15] LI J, YANG X, SWALLAH M S, et al. Structure and rheology of foams stabilized by different soybean varieties deficient in  $\beta$ -conglycinin subunits trimers [J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 131: 107749.
- [16] LI J M, CHEN Z. Fabrication of heat-treated soybean protein isolate-EGCG complex nanoparticle as a functional carrier for curcumin [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 159: 113059.
- [17] MINIĆ D A P, MILIN Ć I Ć D D, KOLAŠINAC S, et al. Goat milk proteins enriched with *Agaricus blazei* Murrill ss. Heine extracts: Electrophoretic, FTIR, DLS and microstructure characterization [J]. *Food Chemistry*, 2023, 402: 134299.
- [18] IGARTÚA D E, PLATANIA F A, BALCONE A, et al. Impact of heat treatment in whey proteins-soluble soybean polysaccharides electrostatic complexes in different pH and biopolymer mass ratio conditions [J]. *Applied Food Research*, 2022, 2(2): 100184.
- [19] ZHANG Y, CHEN S, QI B K, et al. Complexation of thermally-denatured soybean protein isolate with anthocyanins and its effect on the protein structure and *in vitro* digestibility [J]. *Food Research International*, 2018, 106: 619-625.
- [20] WEI Y, WANG C, LIU X, et al. Co-encapsulation of curcumin and  $\beta$ -carotene in Pickering emulsions stabilized by complex nanoparticles: Effects of microfluidization and thermal treatment [J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 122: 107064.
- [21] 倪洋. 白果壳纳米纤维素的制备及其在皮克林乳液中的应用 [D]. 无锡: 江南大学, 2022. (NI Y. Preparation of nanocellulose from ginkgo seed shells and its application in Pickering emulsions [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.)
- [22] YANG Y J, TAO G J, LIU P, et al. Peptide with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity from hydrolyzed corn gluten meal [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(19): 7891-7895.
- [23] DAI C H, ZHANG W W, HE R H, et al. Protein breakdown and release of antioxidant peptides during simulated gastrointestinal digestion and the absorption by everted intestinal sac of rapeseed proteins [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 86: 424-429.
- [24] YU H L, SHI K, LIU D, et al. Development of a food-grade organogel with high bioaccessibility and loading of curcuminoids [J]. *Food Chemistry*, 2012, 131(1): 48-54.
- [25] ADLER-NISSEN J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1979, 27(6): 1256-1262.
- [26] QIAN C, DECKER E A, XIAO H, et al. Nanoemulsion delivery systems: Influence of carrier oil on  $\beta$ -carotene bioaccessibility [J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(3): 1440-1447.
- [27] LI X Y, CHENG M, LI J, et al. Change in the structural and functional properties of goat milk protein due to pH and heat [J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(2): 1337-1351.
- [28] 梁会会. 大豆分离蛋白流变学特性对组织蛋白品质的影响 [D]. 郑州: 河南工业大学, 2021. (LIANG H H. Effect of rheological properties of soybean protein isolate on quality of tissue protein [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2021.)
- [29] ORTIZ D G, POCHAT-BOHATIER C, CAMBEDOUZOU J, et al. Current trends in Pickering emulsions: Particle morphology and applications [J]. *Engineering*, 2020, 6(4): 468-482.
- [30] ZHOU S J, HAN L, LU K Y, et al. Whey protein isolate-phytosterols nanoparticles: Preparation, characterization, and stabilized food-grade pickering emulsions [J]. *Food Chemistry*, 2022, 384: 132486.
- [31] KANG D, ZOU Y, CHENG Y, et al. Effects of power ultrasound on oxidation and structure of beef proteins during curing processing [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2016, 33: 47-53.
- [32] DUAN X, LI M, MA H J, et al. Physicochemical properties and antioxidant potential of phosvitin-resveratrol complexes in emulsion system [J]. *Food Chemistry*, 2016, 206: 102-109.
- [33] NAGY K, COURTET-COMPONDU M C, WILLIAMSON G, et al. Non-covalent binding of proteins to polyphenols correlates with their amino acid sequence [J]. *Food Chemistry*, 2012, 132(3): 1333-1339.
- [34] DELOID G M, SOHAL I S, LORENTE L R, et al. Reducing intestinal digestion and absorption of fat using a nature-derived biopolymer: Interference of triglyceride hydrolysis by nanocellulose [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(7): 6469-6479.
- [35] DIMA C, ASSADPOUR E, DIMA S, et al. Bioavailability of nutraceuticals: Role of the food matrix, processing conditions, the gastrointestinal tract, and nanodelivery systems [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19(3): 954-994.
- [36] FENG K, WEI Y S, HU T G, et al. Colon-targeted delivery systems for nutraceuticals: A review of current vehicles, evaluation methods and future prospects [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 102: 203-222.
- [37] LI X H, LI Y, HUA Y F, et al. Effect of concentration, ionic strength and freeze-drying on the heat-induced aggregation of soy proteins [J]. *Food Chemistry*, 2007, 104(4): 1410-1417.
- [38] SALVIA-TRUJILLO L, QIAN C, MARTÍN-BELLOSO O, et al. Influence of particle size on lipid digestion and  $\beta$ -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(2): 1472-1480.